家蝇滞育幼虫血淋巴中抗病毒肽甲醇萃取方法的优化

阎　岩[1]，吴建伟[2,*]，罗　杰[2]，洪　牧[3]，国　果[2]，付　萍[2]
（1. 贵州省疾病预防控制中心，贵阳 550004；2. 贵阳医学院，贵阳 550004；3. 锦州医学院，辽宁锦州 121001）

摘要：为了优化甲醇萃取滞育家蝇 *Musca domestica* 幼虫血淋巴中抗病毒肽的方法，本实验分别比较甲醇及乙腈萃取血淋巴中抗病毒组分效果及最佳使用梯度、上样蛋白浓度、洗脱次数、洗脱流速及操作环境温度，用 Tricine-SDS-PAGE 分析甲醇及乙腈的洗脱组分的构成。结果表明：甲醇萃取的活性组分多于乙腈萃取的；用连续梯度（10% ~ 100%）甲醇萃取的抗病毒活性组分，比分别用 10%，30%，50%，70%，90% 和 20%，40%，60%，80%，100% 间断梯度洗脱的回收率高，同时获得活性组分的重现性好。在 0 ~ 4℃ 冰浴的环境下，于 250 mg/6 mL C_{18} 萃取柱内加入 1.5 ± 0.4 mg/mL 蛋白浓度的血淋巴粗提液，用 1 mL/min 流速 4 次洗脱，抗病毒活性组分可以得到较好的分离效果。

关键词：家蝇；滞育；血淋巴；抗病毒肽；固相萃取；甲醇
中图分类号：R384，Q966　　**文献标识码**：A　　文章编号：0454-6296(2009)06-0624-07

Optimization of the method for solid phase extraction of antiviral peptides from haemolymph of diapausing larvae of *Musca domestica* with methanol

YAN Yan[1], WU Jian-Wei[2,*], LUO Jie[2], HONG Mu[3], GUO Guo[2], FU Ping[2] (1. Guizhou Provincial Center for Disease Control and Prevention, Guiyang 550004, China; 2. Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 3. Jinzhou Medical College, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: In order to optimize the conditions of antiviral peptide extraction from haemolymph of diapausing housefly (*Musca domestica*) larvae with methanol, we compared the separating results of methanol and methyl cyanide and selected the best extraction gradient. After studying the proper protein sample concentration, eluting times, eluting velocity and eluting temperature, we got a better protocol which leads to perfect results of antiviral peptide extraction. Tricine-SDS-PAGE results showed that continuous gradient methanol as an extractive organic solvent eluted more active fractions than methyl cyanide ($P < 0.05$), and the continuous gradient elution with mthanol (10% - 100%) was better than interrupted gradient (10%, 30%, 50%, 70% and 90%; 20%, 40%, 60%, 80% and 100%, respectively) in the recovery rate and reproducibility of active fractions. Under 0 - 4℃, when 1.5 ± 0.4 mg/mL haemolymph extracts was added into Sep-Pak C_{18} catridge and eluted 4 times with the flowing velocity of 1 mL/min, the antiviral fractions were separated better. Upon electrophoresis, only 2 target protein bands of active fractions were eluted by methyl cyanide, while more bands were eluted by methanol.

Key words: *Musca domestica*; diapause; hemolymph; antiviral peptide; solid phase extract; methanol

昆虫是自然界最大的一类生物群体，自从在昆虫体内发现了广谱抗菌的抗菌肽以来，人们开始关注它的抗病毒作用。Parker 和 Ourth(1999)报道烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 幼虫的血淋巴对 6 种 DNA、RNA 病毒有明显的抑制作用，表现为病毒感染力迅速下降，Wachinger 等(1998)研究蜂毒素和天蚕素可以在亚毒性浓度下抑制艾滋病毒 HIV-1 的基因表达，从而减少 HIV-1 的增殖。抗病毒肽具有分子量小、热稳定性和水溶性好、不易被酶水解、无免疫原性等特点(赵东红等，1999)。当今世界多种病毒特

基金项目：国家自然科学基金项目(39970087)；贵州省教育厅项目(黔科教办[2003]04)；贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字(2004)3006)]
作者简介：阎岩，女，1981 年 6 月生，硕士研究生，医师，研究方向为昆虫免疫，E-mail：yanyana20@163.com
＊通讯作者 Author for correspondence, E-mail：wjw@gmc.edu.cn
收稿日期 Received：2008-12-22；接受日期 Accepted：2009-04-02

别是艾滋病毒正以极快的速度危害人类的健康，昆虫抗病毒肽极有可能成为抗病毒药物的新来源。

固相萃取（solid-phase extraction，SPE）为上世纪 70 年代末发展起来一种微量样品处理技术，具有针对目标化合物回收率高，准确、灵敏、简便的特点，主要用于生物样品的分离、纯化和浓缩。在国外，该方法多用于抗菌肽的研究。

陈艳和李金福（2004）曾初步证实家蝇幼虫的组织匀浆有抗流感病毒的活性，本课题组采用乙腈固相萃取的方法进一步分离家蝇幼虫血淋巴中抗菌肽，经细胞病变法检测分离组分具有抗病毒活性。但由于家蝇幼虫血淋巴成分复杂，且萃取受洗脱液特性、上样量、流速、环境温度等多因素的影响，使得到的组分抗病毒活性检测结果重现性差，阻碍研究进行。

很多昆虫抗菌肽都是从滞育的材料中提取出来的，有的已经在临床上应用，而未滞育幼虫没有得到相同的效果，这与昆虫滞育时的生理状态有关（Faye *et al*.，1975；Hultmark *et al*.，1982；Chernysh and Kim，2002），可见建立昆虫滞育模型有利于昆虫抗菌肽的研究。因家蝇具有兼性滞育和易于人工饲育，故本文选其 3 龄滞育幼虫，对影响血淋巴中抗病毒肽固相萃取分离效果的因素进行研究，以期获得高活性的抗病毒肽。

1　材料和方法

1.1　试虫来源及滞育诱导

1.1.1　虫源：驯化家蝇由贵阳医学院寄生虫教研室 2000 年在贵阳郊区网捕定种后建立种群。成蝇以奶粉和糖为饲料，清水另置；幼虫以麦麸、蛆粉和水发酵后的混合物为饲料。亲代在 20～25℃，湿度 45%～50% 及光周期 L12∶D12 环境下饲养，收集家蝇卵备用。

1.1.2　滞育诱导：依据刘流等（2006）认为温度是家蝇滞育的主要环境因素，取家蝇卵在 15℃，相对湿度 70% 及 L12：D12 环境下孵化后饲养，诱导家蝇幼虫滞育。以生长至 3 龄幼虫所需的历期是适宜温度下（20～25℃）幼虫发育最短历期的 3 倍以上为滞育状态，15℃ 环境下家蝇的滞育率达到 100%。

1.2　病毒株

单纯疱疹病毒 Ⅰ 型/SM44 株，由贵阳医学院免疫学教研室惠赠。

1.3　细胞株

人喉表皮样癌细胞株（Hep-2 cells），源自中国 CDC 细胞库，由贵州省疾病控制中心提供，经本室传代培养备用。

1.4　主要试剂

乙腈（ACN）和甲醇（MET）均为美国 Tedia 公司 HPLC 级产品；三氟乙酸（TFA）购自美国 Sigma 公司；蛋白分析试剂盒购自美国 Pierce 公司；MEM 培养基购自 HyClone 公司；新生小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.5　固相萃取抗病毒肽影响因素的研究

1.5.1　家蝇 3 龄幼虫热诱导后提取血淋巴：将滞育家蝇 3 龄幼虫热诱导（高松等，2007）后在麦麸中 25℃ 饲养，36 h 后（幼虫有部分开始化蛹），洗净消毒，冰上麻醉，每个柱子进行萃取实验需剪头 200 头幼虫，每 50 头幼虫的血淋巴收集到 1 mL 的生理盐水中，参考吴冠芸（2002）方法对血淋巴蛋白质进行分级离心（4℃，3 500-7 000-12 000 r/min，各 15 min），最后吸取上清为粗提液，进行以下工作。

1.5.2　萃取剂及洗脱梯度的选择：选用乙腈及甲醇两种萃取剂进行洗脱效果的比较。设立乙腈萃取组和甲醇萃取组，重复 5 次实验。根据固相萃取的原理（王新春等，2001；吴华，2005），先分别用纯乙腈和纯甲醇活化 250 mg/6 mL 规格的 C_{18} 萃取柱，各取 6 mL 同一批血淋巴粗提液，上柱吸附后，用酸化萃取剂（含 0.05% TFA）分别进行连续梯度（10%～100%）及间断梯度（10%，30%，50%，70%，90% 和 20%，40%，60%，80%，100%）洗脱。收集 2 组各梯度的洗脱液，冻干浓缩后，分别用等量的生理盐水溶解，检测各梯度洗脱组分的体外抗病毒活性，用美国 Pierce 公司试剂盒测定蛋白质浓度；各组分别合并活性组分后，计算 2 组洗脱活性组分的蛋白质回收率，分别对洗脱梯度和萃取剂进行优选，以选定条件进行以下研究。

1.5.3　萃取粗提液蛋白浓度的选择：按照试剂盒方法测定粗提液的蛋白质浓度，根据所购 C_{18} 萃取柱上样规格，倍比稀释为 3 个萃取初始浓度，各组上样 6 mL，用甲醇连续梯度萃取。收集并冻干各洗脱组分，用生理盐水溶解，检测 3 个萃取组各萃取梯度洗脱组分的抗病毒活性后，合并活性组分，比较 3 组活性组分的蛋白量及体外抗病毒效果。

1.5.4　不同洗脱次数的洗脱组分回收量测定：用酶标仪（OD_{214}）监测，以甲醇连续梯度洗脱对一次上样血淋巴进行 4 次重复洗脱，监测每次各梯度萃取洗脱组分蛋白量的变化。收集样本，冻干，用生理盐水溶解后，检测每次洗脱出蛋白量占总蛋白的百分比。

1.5.5 洗脱流速的选择:粗提液生理盐水倍比稀释3倍后，分别选用2，1和0.5 mL/min 的3种洗脱速度进行甲醇连续梯度洗脱，用倒计时的秒表来控制手工操作的时间。收集并冻干各组分，用生理盐水溶解，检测3个萃取组各萃取梯度洗脱组分的抗病毒活性后，合并活性组分，比较活性组分的蛋白量及抗体外病毒效果。

1.5.6 合适的萃取操作温度的选择:分别在0~4℃冰浴，20和30℃3种环境温度下用甲醇萃取，收集并冻干各组分，用生理盐水溶解，检测3个萃取组各萃取梯度洗脱组分的抗病毒活性后，合并活性组分，用美国 Pierce 公司试剂盒测定比较活性组分的蛋白量并比较抗体外病毒效果。

1.6 检测活性组分抗病毒的活性

供试病毒株为单纯疱疹病毒Ⅰ型/SM44 株,靶细胞为喉癌细胞(Hep-2),照常规方法传代培取单层喉癌细胞培养板，弃去培养液，接种100倍 $TCID_{50}$(病毒半数感染剂量)的单纯疱疹病毒液100 μL 于细胞孔，置36℃、5% CO_2 培养箱中吸附1 h，吸去病毒液，用 D-hank 氏液洗细胞2次，加入从最大无毒浓度(TC_0)起经维持液(含2%牛血清)倍比稀释6个浓度的各个萃取组分100 μL/孔，各浓度加3孔，以药物阿昔洛韦(ACV)处理为抗病毒阳性对照，以单纯疱疹病毒处理为阴性对照，并设置正常细胞对照，加入维持液到100 μL/孔。置36℃、5% CO_2 培养箱中培养3~4 d，每天在倒置显微镜下观察细胞病变进展。

利用细胞病变法(cytopathic effect, CPE)观察，并用 Reed-Muench 法(张均田，1998)计算活性组分的 TC_0，半数毒性浓度(TC_{50})，半数有效浓度(IC_{50})；选择指数 SI ($SI = TC_{50}/IC_{50}$)，SI < 1 为无效，1 < SI < 2 为低效高毒，SI > 2 为有效。实验中以加样孔 CPE > 25% 为阳性，以病毒对照 CPE > 75% 为实验终点。

1.7 抗病毒肽的 Tricine-SDS-PAGE 分析

参照缪时英(2002)方法，制备 Tricine-SDS-PAGE 分离胶、样品胶、成层胶三层凝胶。电泳电压设置为：样品胶及成层胶 90 V；分离胶 120 V。低分子量 Marker:97.4 kD 兔磷酸化酶、66.2 kD 牛血清白蛋白、43 kD 兔肌动蛋白、31 kD 牛碳酸酐酶、20.1 kD 胰蛋白酶抑制剂、14.4 kD 鸡蛋清溶菌酶；超低分子量 Marker：16.949 kD Globin，14.404 kD Globin Ⅰ+Ⅱ，10.700 kD GlobinⅠ+Ⅲ，8.459 kD Globin Ⅰ，6.214 kD Globin Ⅱ，2.512 kD Globin Ⅲ。

2 结果与分析

2.1 萃取剂及洗脱梯度的选择

2.1.1 萃取剂的选择:从表1可以看出，采用连续梯度洗脱法，乙腈组仅30%和70%为有效洗脱梯度，而甲醇组的有效洗脱梯度要比乙腈组多，并且甲醇组的抗病毒活性组分蛋白量和回收率都高于乙腈组，经过 *t* 检验，回收率差异达显著性水平($P < 0.05$)。

表1 甲醇及乙腈的有效梯度及活性组分回收率的比较($n = 5$)

Table 1 Comparison of effective elution gradients of methanol and methyl cyanide and recovery rate of active antiviral fractions ($n = 5$)

萃取剂 Extractant	有效梯度(%) Effective gradient	粗提液总蛋白量 Total protein of haemolymph extracts (mg/mL)	洗脱活性组分蛋白量 Active protein after extraction (mg/mL)	活性组分回收率(%) Recovery rate of active antiviral fractions
乙腈 Methyl cyanide	30, 70	12.2 ± 1.3	1.6 ± 0.4	13.25
甲醇 Methanol	40, 50, 60, 70, 80, 90, 100	12.2 ± 1.3	7.5 ± 0.3	61.57

2.1.2 洗脱梯度的选择:48 h 后，由 CPE 法观察各组分的抗病毒活性发现，用甲醇连续梯度洗脱的组分活性(图1:A)明显优于间断梯度洗脱组(图1:B, C)，并且连续梯度洗脱组分的活性重现性好。根据活性检测结果(图2)，以下研究均选用甲醇连续梯度进行抗病毒组分洗脱。

2.2 萃取蛋白上样浓度的选择

粗提血淋巴蛋白浓度为12.2 ± 1.3 mg/mL，倍比稀释后得到A，B，C 3组浓度的粗提液，A组蛋白浓度及黏度高，增大洗脱压力，不易洗脱。从表2可以看出，A组洗脱组分的1 < SI < 2为低效高毒，B、C组 SI > 2 为有效，经 *t* 检验，B组与C组的 SI 差异没有显著性($P > 0.01$)，但从 TC_0，TC_{50} 和 IC_{50} 来比较，C组比B组洗脱的活性组分抗病毒作用好，其毒性小，最终选用1.5 ± 0.4 mg/mL 浓度的粗提液上样。

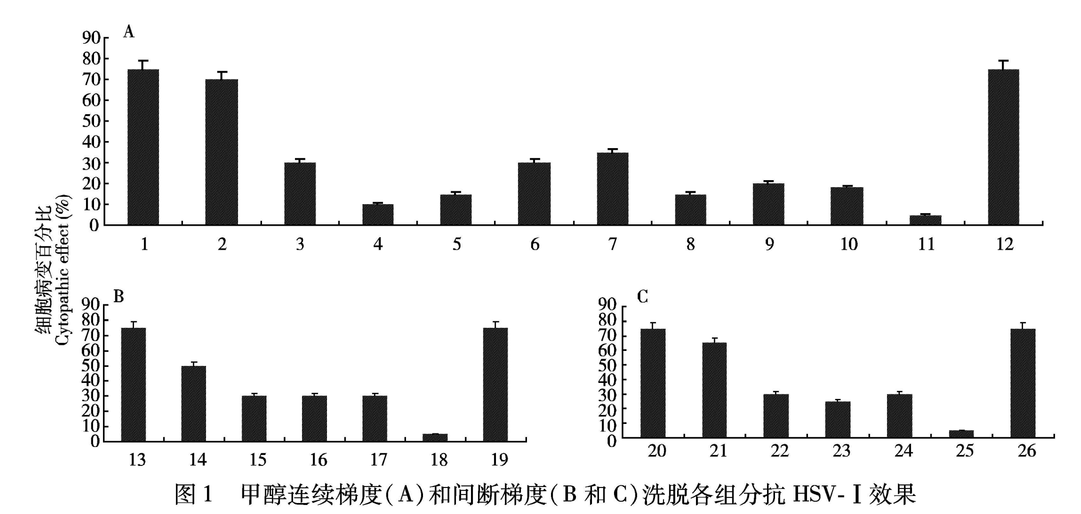


图 1　甲醇连续梯度(A)和间断梯度(B 和 C)洗脱各组分抗 HSV-Ⅰ效果

Fig. 1 Anti- HSV-Ⅰ effect of every fractions eluted by continuous gradient methanol (A) and interrupted gradient methanol (B, C)

1－10:分别代表 10% ～100% 甲醇洗脱组分 Fractions eluted by 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, and 100% methanol treatment, respectively; 11, 18, 25: 阳性对照[阿昔洛韦(ACV) 处理]ACV treatment as the positive control; 12, 19, 26: 阴性对照(单纯疱疹病毒液处理)Herpes simplex virus treatment as the negative control. 13: 20% MET; 14: 40% MET; 15: 60% MET; 16: 80% MET; 17: 100% MET; 20: 10% MET; 21: 30% MET; 22: 50% MET; 23: 70% MET; 24: 90% MET.

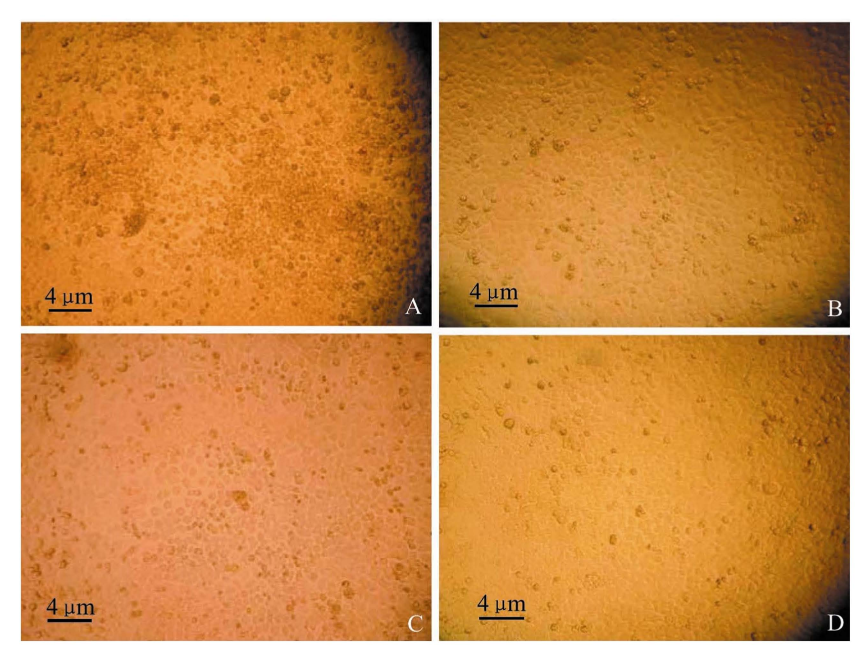


图 2　甲醇洗脱活性组分的抗病毒作用

Fig. 2 Antiviral activity of fractions eluted by methanol

A: 单纯疱疹病毒-1 在 Hep-2 细胞上的病变(阳性对照)Affection of HSV-1 in Hep-2 cells (positive control); B: 正常的 Hep-2 细胞对照(阴性对照)Normal Hep-2 cell control (negative control); C: 甲醇洗脱活性组分抗病毒作用 Antiviral effect of fraction eluted by methanol; D:阳性药物对照 Positive drug control.

表 2　连续梯度甲醇洗脱 3 种浓度血淋巴粗提液抗病毒效果的比较(n=5)

Table 2 Comparison of the antiviral effect of fractions eluted from three contentrations of haemolymph by continuous gradient methanol (n=5)

分组 Grouping	粗提液蛋白量 Protein of haemolymph extracts (mg/mL)	活性组分蛋白量 Protein of active fractions (mg/mL)	TC_0 (μg/mL)	TC_{50} (μg/mL)	IC_{50} (μg/mL)	SI
A	6.3 ±0.6	2.7 ±1.2	102.5 ±12.2	163.1 ±6.5	135.9 ±11.8	1.20
B	3.1 ±0.2	1.3 ±0.3	85.3 ±9.3	135.5 ±15.1	24.9 ±8.6	5.44
C	1.5 ±0.4	0.8 ±0.4	74.5 ±6.3	118.6 ±9.3	22.8 ±7.3	5.20

2.3 洗脱次数与洗脱组分回收量测定

经酶标仪监测，以洗脱 4 次的蛋白回收率和为 100%，甲醇连续梯度洗脱的蛋白回收率第 1 次为 33%，第 2 次 26%，第 3 次 23%，第 4 次 18%，第 1 次洗脱出来的量最多(图 3)。经萃取前后蛋白含量检测，洗脱 4 次后的蛋白总量约占粗提液蛋白总量的 79%，其余约 21% 蛋白量可能因未吸附于萃取柱上和虽吸附但未洗脱而损失。

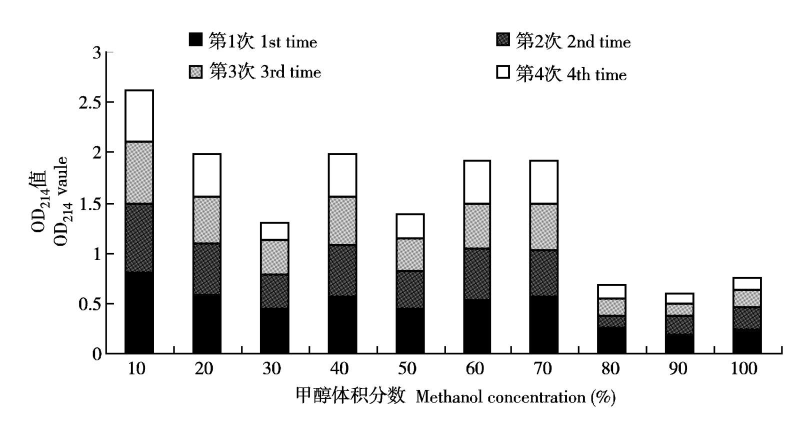


图 3 甲醇连续梯度洗脱 4 次各次抗病毒组分溶液的 OD_{214} 值比较

Fig. 3 Comparison of the OD_{214} values of anti-viral fractions eluted by continuous gradient methanol for four times

2.4 洗脱流速的选择

甲醇流速为 2 mL/min 时洗脱组分的 SI < 1 为无效，流速为 1 和 0.5 mL/min 洗脱组分的 SI > 2 为有效。经过 *t* 检验，萃取流速为 1 和 0.5 mL/min 洗脱活性组分的蛋白含量及抗病毒效果 SI 差异没有显著性($P > 0.01$)(表 3)。为了工作效率，我们选用 1 mL/min 的流速来萃取。

表 3 3 种流速的连续梯度甲醇洗脱活性组分的抗病毒效果的比较($n = 5$)

Table 3 Comparison of the antiviral effect of fractions eluted by continuous gradient methanol with three flowing velocities ($n = 5$)

流速 Flowing velocity(mL/min)	活性组分蛋白量 Protein of active fractions (mg/mL)	TC_0 (μg/mL)	TC_{50} (μg/mL)	IC_{50} (μg/mL)	SI
2	0.9 ± 0.1	78.1 ± 6.0	127.3 ± 14.8	139.7 ± 21.5	0.90
1	1.3 ± 0.4	85.1 ± 9.3	135.5 ± 15.1	24.9 ± 8.6	5.44
0.5	1.2 ± 0.2	75.2 ± 11.6	119.5 ± 10.2	26.5 ± 7.4	4.51

2.5 萃取操作温度的选择

洗脱时萃取剂冰浴，萃取柱保持在 0 ~ 4℃，柱上吸附蛋白不会发生黑变；而萃取剂及萃取柱保持在 20℃和 30℃环境下，粗提样品洗脱下来的组分冻干后有变黑的现象，并且经抗病毒活性检测，30℃环境下洗脱的组分没有抗病毒活性。从表 4 可以看出，0 ~ 4℃环境下萃取组分的抗病毒效果 SI > 2 为有效，在 20℃环境下萃取组分的抗病毒效果 1 < SI < 2为低效高毒。

表 4 2 种环境温度下连续梯度甲醇洗脱活性组分的抗病毒效果的比较($n = 5$)

Table 4 Comparison of the antiviral effect of fractions eluted by continuous gradient methanol under two environmental temperatures ($n = 5$)

环境温度 Environmental temperature (℃)	活性组分蛋白量 Protein of active fractions (mg/mL)	TC_0 (μg/mL)	TC_{50} (μg/mL)	IC_{50} (μg/mL)	SI
0 – 4	1.3 ± 0.4	85.1 ± 9.3	135.5 ± 15.1	24.9 ± 8.6	5.44
20	0.9 ± 0.1	94.3 ± 11.3	150.0 ± 7.5	84.2 ± 8.6	1.78

2.6　Tricine-SDS-PAGE 比较两种萃取剂洗脱活性组分

30% 乙腈萃取活性组分的分子量在 20.1 kD 以下有 1 条带，70% 乙腈萃取活性组分的分子量在 20.1 kD 以下及在 14.4 kD 以下共有 2 个条带，有 1 条共同条带(图 4：A)。

与乙腈萃取的活性组分相比，甲醇萃取得到的蛋白量多，电泳条带多，分离效果好，40% ~100% 甲醇萃取的组分均具有抗病毒活性，经多次电泳检测活性组分的分子量，提示在 20.1,10.7 和 8.4 kD 附近的条带为抗病毒活性肽，如箭头所指(图 4：B)。

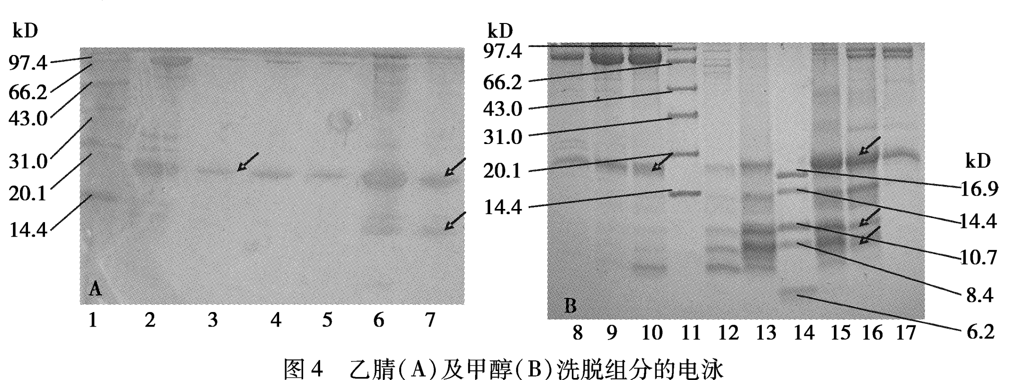


图 4　乙腈(A)及甲醇(B)洗脱组分的电泳

Fig. 4 Electrophoresis of fractions eluted by methyl cyanide (A) and methyl alcohol (B)

1，11：低分子量标准蛋白 Low molecular weight protein marker；2 －7：分别为 20% ~70% 乙腈洗脱组分 Fractions eluted by 20%，30%，40%，50%，60% and 70% methyl cyanide，respectively；8 －10，12 －13，15 －17：分别为 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80% 和 100% 甲醇洗脱组分 Fractions eluted by 20%，30%，40%，50%，60%，70%，80% and 100% methanol，respectively；14：超低分子量标准蛋白 Super low molecular weight protein marker.

3　讨论

乙腈-水系的洗脱能力强，是目前反相色谱常用的流动相。本研究比较乙腈和甲醇两种萃取方法对滞育家蝇幼虫血淋巴的抗病毒肽的萃取效果，结果表明甲醇萃取效果优于乙腈萃取，电泳检测组分的条带也多，筛选范围大。可能是由于家蝇幼虫血淋巴中与甲醇极性相近的组分较多，具有抗病毒作用的多肽片段具有与之相近的极性，也可能由于甲醇为质子性，而乙腈为非质子性所致的分离效果差异，使甲醇萃取得到组分的有效洗脱梯度比乙腈要多，且洗脱组分的获得量也比乙腈的高。连续梯度洗脱能使各组分均有合适的 k 值并分离良好，常用于分离含极性差别较大的多组分样品，本研究结果出现多个梯度组分具有抗病毒作用，提示家蝇幼虫血淋巴中存在极性不同抗病毒多肽分子，其各组分抗病毒活性成分的分子差异尚待进一步研究。

本研究结果表明，萃取采用0 ~4℃冰浴的环境下，于 250 mg/6 mL C_{18}萃取柱内加入 1.5 mg/mL 蛋白浓度的血淋巴粗提液，用 1 mL/min 流速的甲醇多次洗脱，抗病毒活性组分取得了较好的分离效果。提示冰浴环境使氧化酶活性没有激活，并且根据 C_{18}固相萃取柱的承载量及该样品的粘度，本实验摸索粗提液要稀释至 1.50 mg/6 mL 左右为合适的萃取分离上样蛋白浓度。同时我们发现萃取时速度是控制分离效果的一个重要因素，2 mL/min 的速度分离的组分抗病毒检测 SI < 1，无抗病毒效果，而 1 和 0.5 mL/min 分离的组分 SI > 2，具有抗病毒活性。可能是速度快使萃取剂不能充分与目标蛋白接触，达不到分离目标蛋白的目的，致使组分中非目标蛋白干扰抗病毒肽的抗病毒效果，如果速度太慢，血淋巴中免疫活性肽可能会受环境等因素的影响而失活，因此我们认为选择适宜的洗脱速度可以提高昆虫血淋巴中免疫多肽分离效果。由于从家蝇幼虫血淋巴中萃取抗病毒肽，需要经过养蛆、剪头取血淋巴的过程，非常费时。本研究采用上样后多次洗脱，第 2 次和 3 次可以获得与第 1 次洗脱相近的蛋白量，表明一次上样多次洗脱，可充分地将吸附在萃取柱上的活性组分洗脱收集，减少了血淋巴制备时间，节约样本，提高了工作效率。

固相萃取目标化合物简便，得率高，分离效果好，不需要透析脱盐，对目标蛋白的损伤小。本研究表明，根据所分离的目标分子，选择适宜的样本制备方法、萃取洗脱剂、洗脱方式、上样浓度、洗脱速度等才能取得有效的分离结果。

参 考 文 献 (References)

Chen Y, Li JF, 2004. The study of anti-virus activity of *Musca domestica* larval homogenate. *Journal of Topical Medicine*, 4(2): 130 －132. [陈艳，李金福. 家蝇幼虫组织匀浆液抗病毒活性的研究. 热带

医学杂志, 4(2): 130 - 132]

Chernysh I, Kim SI, Bekker G, Pleskach VA, Filatova NA, Anikin VB, Platonov VG, Bulet P, 2002. Antiviral and antitumor peptides from insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(20): 12 628 - 12 632.

Faye I, Pye A, Rasmuson T, Boman HG, Boman IA, 1975. Simultaneous induction of antibacterial activity and selective synthesis of some hemolymph proteins in diapausing pupae of *Hyalophora cecropia* and *Samia cynthia* infection and immunity. Infection and *Immunity*, 12: 1 426 - 1 438.

Gao S, Wu JW, Fu P, Zhang AM, Dong XC, 2007. Effect of different inducible agents on antifungal peptides of housefly larvae and their antifungal activity. *Acta Entomol. Sin.*, 50(10): 1 009 - 1 015. [高松, 吴建伟, 付萍, 张阿梅, 董熙昌, 2007. 家蝇幼虫血淋巴中抗真菌肽的诱导方法比较及抗真菌活性. 昆虫学报, 50(10):1 009 - 1 015]

Hultmark D, Håkan S, Rasmuson T, Boman HG, 1982. Insect immunity: Isolation and structure of cecropin D and four minor antibacterial components from *Cecropia* pupae. *Eur. J. Biochem.*, 127: 207 - 217.

Liu L, Wan QH, He LF, 2006. Effects of temperature and photoperiod on diapause of housefly larvae. *Acta Academiae Medicinae Zunyi*, 29(1): 21 - 22. [刘流, 万启惠, 贺莉芳, 2006. 温度和光周期对家蝇幼虫滞育的影响. 遵义医学院学报, 29(1): 21 - 22]

Miu SY, 2002. Protein electrophoresis. In: Wu GY, Pan HZ, Wu H eds. Frequently-Used Data Manual of Biochemistry and Molecular Biology Experiments. Science Press, Beijing. 190 - 205. [缪时英, 2002. 蛋白质电泳. 见:吴冠芸, 潘华珍, 吴翚主编. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京: 科学出版社. 190 - 205]

Parker MS, Ourth DD, 1999. Specific binding of human interferon-gamma to particulates from hemolymph and protocerebrum of tobacco hornworm (*Manduca Sexta*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.*, 122(2): 155 - 163.

Wachinger M, Kleinschmidtet A, Winder D, von Pechmann N, Ludvigsen A, Neumann M Holle R, Salmons B, Efle V, Brack-Werner R, 1998. Antimicrobial peptides melittin and cecroppin inhibit replication of human immunodeficiency virus 1 by suppressing viral gene expression. *Journal of General Virology*, 79(4): 731 - 740.

Wang XC, Yang CM, Hou SX, Li ZW, 2001. The application and development of solid phase extract-high performance liquid chromatography for analysis of biological specimen. *Chin. Hosp. Pharm.*, 21(12):747 - 748. [王新春, 阳长明, 侯世祥, 李章万, 2001. 固相萃取-高效液相色取法在生物样品分析中的应用与进展. 中国医院药学杂志, 21(12):747 - 748]

Wu GY, 2002. Ultracentrifugation. In: Wu GY, Pan HZ, Wu H eds. Frequently-Used Data Manual of Biochemistry and Molecular Biology Experiments. Science Press, Beijing. 87 - 104. [吴冠芸, 2002. 超速离心. 见:吴冠芸, 潘华珍, 吴翚主编. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京: 科学出版社. 87 - 104]

Wu H, 2005. Solid phase extraction (SPE) and its applications on environmental sample preparation. *Modern Instrument*, 1: 27 - 29. [吴华, 2005. 固相萃取技术及其在环境分析中的应用. 现代仪器, 1: 27 - 29]

Zhang JT, 1998. Modern Experimental Methods of Pharmacology (Vol. 2). Peking University Health Science Center and Peking Union Medical College Associated Press, Beijing. 1 429 - 1 432. [张均田, 1998. 现代药理实验方法(下册). 北京:北京医科大学/中国协和医科大学联合出版社. 1 429 - 1 432]

Zhao DH, Dai ZY, Zhou KY, 1999. Mechanism of function and action and molecular biological development of insect antibacterial peptide lately. *Biological Engineering Progress*, 16(3): 14 - 17. [赵东红, 戴祝英, 周开亚, 1999. 昆虫抗菌肽的功能作用机理与分子生物学研究最新进展. 生物工程进展, 16(3): 14 - 17]

(责任编辑:邓艳)